植物病理學會刊　13: 69-84, 2004

由茉莉花 (*Jasminum sambac*) 分離之一種新 potyvirus 之特性研究

林宜螢[1]　陳滄海[1,3]　張清安[2]

1 屏東縣內埔鄉 國立屏東科技大學植物保護系
2 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所植病組
3 聯絡作者：電子郵件 thchen@mail.npust.edu.tw，傳真：+886-8-7740293
接受日期：中華民國 93 年 3 月 8 日

摘　要

林宜螢、陳滄海、張清安. 2004. 由茉莉花 (*Jasminum sambac*) 分離之一種新 potyvirus 之特性研究. 植病會刊 13: 69-84.

1995 年筆者等在高屏地區首度發現田間茉莉花葉片出現嚴重黃化嵌紋之病徵，病徵初期呈現不規則黃斑，最後漸擴大至整個葉片黃化，經調查主要栽培區的田間病徵約可區分爲無病徵感染、不規則黃斑及嚴重黃化嵌紋等三類。以電顯陰染觀察茉莉花病葉粗汁液，發現其內至少含有三種長度不一絲狀粒子的病毒病原，乃一複合感染之病害。經由機械接種可以由紅藜及奎藜成功分離出一種粒子長 720 - 750 nm 微彎曲之長絲狀病毒，此爲台灣地區的首次茉莉花病毒病害之報導。病毒熱不活化溫度爲 50-55 ℃；耐稀釋度爲 10^{-3}-10^{-4}；室溫 (24℃)下 活性可維持 2 - 3 天，冷凍 (-70℃) 保存可維持 10 個月；電顯觀察紅藜單斑病組織超薄切片可於細胞質中見到 potyviruses 所誘導形成之典型風車狀 (pinwheels) 及薄板狀 (laminated aggregates) 內含體；而在黃化嵌紋茉莉花病組織之切片中，亦可觀察到細胞核、葉綠體、粒線體等細胞胞器的病變。機械接種 12 科 56 種供試植物，僅藜科 3 種植物受感染。蚜媒傳播並未成功。奎藜病葉爲材料經高低速交替離心及硫酸銫密度梯度離心可獲得純化病毒，其鞘蛋白分子量經電泳分析估算約爲 32 kDa；將純化病毒注射於白兔後製備出對應本病毒之專一性抗體。此抗體於西方轉漬反應 (Western blotting)、間接式酵素連結免疫吸附法 (Indirect ELISA)、瓊脂雙向擴散反應 (SDS-agar gel double diffusion test) 下均只與其同源抗原反應，並不與其它 14 種 potyviruses 之抗原反應。進一步以反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 選殖本病毒之核酸，將所解得之核苷酸 (nucleotide, nt) 序列，與已登錄於 GenBank 之 20 種 potyviruses 基因比對，親緣最接近之病毒與本病毒 CP 及 3’-NCR 區域中之核苷酸序列相同度分別低於 69 及 54%；CP 之胺基酸序列相同度則低於 69%。綜合上述病毒形態大小、基本物理特性、細胞病理學、血清學反應及核酸序列比對等種種證據，一致顯示本研究中所分離之病毒爲一新種 potyvirus，亦爲全世界首次成功地由感染茉莉植株中分離出病毒，因此特將此由台灣地區茉莉花黃化嵌紋病所分離之新種 potyvirus 命名爲茉莉病毒 T [Jasmin virus T , JaVT]。

關鍵詞：茉莉花、potyvirus、病毒鑑定、茉莉病毒 T

緒　言

茉莉花 [*Jasminum sambac* (L.) Ait.] 原產於印度、阿拉伯，屬木犀科 (Oleaceae)，茉莉花屬 (*Jasminum*) 之一種無性繁殖半落葉蔓性小灌木，茉莉花在世界各地有不同的名稱[14] 現今菲律賓、印度尼西亞、烏拉圭、巴基斯坦等國皆將茉莉花定爲國花[2,4,8,14]，其主要供作香片花茶及觀賞之花卉。目前在台灣彰化、雲林、台南部分地區作集約或零星栽培。台灣常見的木犀科植物有流蘇樹屬 (*Chionanthus*)、白蠟樹屬 (*Fraxinus*)、茉莉花屬 (*Jasminum*)、女貞屬 (*Ligustrum*)、李欖屬 (*Linociera*)、齊墩果屬 (*Olea*)、木犀屬 (*Osmanthus*)、丁香屬 (*Syringa*) 等八個屬[1]。綜合文獻記載 *Jasminum* 屬之 *J. nudiflorum* (迎春花)、*J. mesnyi* (雲南黃馨)、*J. officinale* (素方花)、*J. polyanthum* (素馨花)、*J. multiflorum* (毛茉莉)、*J. odoratissimum* (黃馨)、*J. sambac* (茉莉花) 等七個種有受

病毒爲害的記錄[10]，而其中茉莉花雖有受 Jasmin chlorotic ringspot virus、*Potato virus* Y group、*Carlavirus* 三種病毒感染的記錄[7,8,25]，但文獻中有關病原病毒的研究甚少且並不完整。1995 年本研究室在高屏地區首度發現田間茉莉花葉片出現嚴重黃化嵌紋之病徵，病徵初期呈現不規則黃斑，最後漸擴大至全葉黃化，雖其病徵與 1975 年菲律賓 Benigno *et al.* [8] 所述類似，但 Benigno *et al.* [8]並未成功分離其病原，有鑑於此一病害在台灣地區爲首次發現，因此本研究目的乃在探討台灣田間茉莉花黃化嵌紋病發生情形，並藉由傳統及分子技術分離、鑑定其病原，進而瞭解病毒之生物學特性，發展檢測技術以作爲病害田間發生生態研究之用。

材料與方法

田間病害發生調查

主要產區調查

彰化縣花壇鄉爲台灣地區茉莉花最主要栽培區，其中以灣雅村、灣東村、三春村、永春村及長春村等五個村爲主要栽培地點[5]，因此選擇上列五個村做爲病害調查樣區，以病徵目視法調查田間茉莉花葉片是否呈現黃化嵌紋的病徵，參考 Sophorn[20] 所述之方法，每村調查三個樣區，每樣區採完全逢機設計 (CRD) 調查 100 叢茉莉花植株，共計調查 1500 叢，求其平均值計算其罹病率。

高屏地區調查

高屏地區之茉莉花栽培均屬零星或庭園式栽培，因此乃先分別逢機採自高雄地區之鳳林二路、岡山鎮、大寮鄉內坑村、小港區、山明路、光武路、梓官鄉及屏東地區之新園鄉五房村、屏東縣九如鄉洛陽村、歸來里、萬丹鄉、鹽埔鄉、內埔鄉義亭村、東片村等十四個地區之茉莉花插穗於溫室扦插成苗後，以病徵目視法調查扦插苗葉片是否呈現黃化嵌紋的病徵。

茉莉花周年性病徵變化調查

採自彰化縣花壇鄉長春村、高雄縣岡山鎮、及屏東縣九如鄉洛陽村、屏東市歸來里、內埔鄉義亭村共五處之茉莉花插穗，扦插成苗後，自 2001 年 7 月至 2003 年 2 月間，每月固定時間，以病徵目視法配合紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 及奎藜 (*C. quinoa*) 接種分離、電顯陰染檢查，長期調查茉莉花葉部病徵變化情形，並參考 Sophorn[20] 所述之方法加以修改，將茉莉花葉片病徵分爲四個等級，分別爲 0：無病徵感染型、1：不規則黃斑型、2：黃斑病徵漸擴大、3：嚴重黃化嵌紋型。

病毒之來源與寄主範圍測定

採自彰化縣花壇鄉長春村田間葉片呈黃化嵌紋之茉莉花插穗於溫室扦插成活後，取具黃化嵌紋病徵之茉莉花病葉片，以 5 倍量內含 0.1% mercaptoethanol 的 0.1 M pH 7.0 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 研磨成汁液，機械接種於已撒佈金剛砂之紅藜及奎藜葉片上，約 6 天即可在紅藜及奎藜接種葉上產生黃色局部單斑，再於紅藜上進行三次單斑分離，分離所得病毒則機械接種於紅藜及奎藜上繁殖與保存，供做後續研究之病毒源。進行寄主範圍測定時乃利用機械接種於莧科、菊科、藜科、旋花科、十字花科、葫蘆科、豆科、錦葵科、紫茉莉科、茄科、繖形花科、薑科等 12 科 56 種供試植物，連續觀察 4 週並記錄病徵表現情形；接種後之供試植物不論是否有病徵出現，均以電顯陰染觀察並將其回接於紅藜上，以確認病毒的感染與否並瞭解是否有潛伏感染之現象。

病毒之生體外物理性質

取感染前述病毒分離株之新鮮紅藜病斑，以 5 倍量之 0.1 M pH 7.0 磷酸緩衝液研磨成汁液，依 Dijkstra and de Jager[11] 之方法，進行病毒之熱不活化溫度 (thermal inactivation point)、耐稀釋度 (dilution end point) 測定及在 24 ℃ 室溫或 -70 ℃ 下之耐保存性。

電子顯微鏡的觀察

陰染法 (Negative staining)：取具黃化嵌紋病徵之茉莉花病葉粗汁液、單斑分離之紅藜單斑及純化病毒之懸浮液，將其吸附於覆有支持膜之銅網上，經 2% 醋酸鈾 (uranyl acetate) 染色，以穿透式電子顯微鏡 (Hitachi, H-7500) 觀察病毒粒子形態並測量其大小。

超薄切片法 (Ultrathin section)：參考陳等[3]及 Itaya *et al.* [12] 報告之方法，取具黃化嵌紋病徵之茉莉花病葉及經單斑分離之紅藜病斑，先以 2.5% 戊二醛前固定，繼以 1% 之四氧化鋨行後固定，再以一系列不同濃度之酒精進行脫水 (50、70、80、90、95%，100%) 及 Suprr’s resin 滲透包埋，利用超薄切片機 (Reichert-Jung Ultracut-E) 切取厚度爲 70 nm 之切片，進行雙重染色，於穿透式電子顯微鏡 (Hitachi, H-7500) 下鏡檢受感染細胞之細胞病變及內含體之形態。

病毒純化及多元抗體之製備

病毒純化：奎藜病葉 250 克，加 2 倍量 (W/V) 內含 0.01 M EDTA、0.1% Na_2SO_3、1% 2-mercaptoethanol 的 0.5 M pH 7.5 磷酸鉀緩衝溶液 (KPB buffer)，利用攪汁機 (Blender, Waring 31BL92) 打碎，以三層紗布過濾，濾液再加 0.5 倍量氯仿 (chloroform) 與四氯化碳 (carbon tetrachloride) 等量混合液，攪拌 1 小時，以 3,500 rpm 離

心 5 分鐘 (Hitachi R14A rotor)，取上層液再以 8,000 rpm 離心 10 分鐘 (Hitachi R14A rotor)，離心後的上層液加 6% PEG 6000 (W/V) 及 0.2 M NaCl，在 4 ℃ 下緩速攪拌 1 小時，再以 10,000 rpm 離心 15 分鐘 (Hitachi R14A rotor)，沈澱物以最初材料 1/2 倍量內含 0.01 M EDTA 之 0.01 M pH 7.5 KPB buffer 充分懸浮，在 4 ℃ 下攪拌 30 分鐘，8,000 rpm 離心 10 分鐘 (Hitachi R20A2 rotor)，取上層液再以 30,000 rpm 離心 1.5 小時 (Hitachi RP70 T rotor)，所得之沈澱物即爲部分純化的病毒，部分純化的病毒以 0.5 ml 之 0.05 M KPB buffer 充分懸浮，再加入 9.5 ml 之 0.05 M KPB buffer 含有 15% (W/V) 硫酸銫攪拌均勻後，緩緩加入底部以 3 ml 之 53% (W/V) 硫酸銫襯底之PET離心管中，在 6 ℃下以 38,000 rpm 密度梯度離心 18 小時 (Hitachi RPS 40T rotor)後，吸取中綿密狀之病毒層，置於透析膜中在 4 ℃下以 0.05 M pH 7.5 KPB buffer 透析，即得純化病毒，以分光光度計 (Hitachi U-2001 spectrophotometer) 測讀其由波長 220 nm 至 320 nm 紫外光吸光值，再依 potyviruses 之吸光係數 (extinction coefficient) = 2.4 爲定量標準換算純化之病毒量[19]。

多元抗體製備：取 0.5 ml 純化之病毒 (1.5 mg/ml) 加入等量之完全佐劑 (Freund’s complete adjuvant) 充分乳化後，進行第一次免疫注射白兔之皮下組織，第二週起改加入等量之不完全佐劑 (Freund’s incomplete adjuvant) 充分乳化後每隔 7 天注射一次，共注射三次。最後一次注射後 10 天即全採血並製備抗血清，同時以環形界面沉澱法測定所製備之抗體力價 (titer)。

病毒鞘蛋白分子量測定

參考 Laemmli [13] 之方法，將純化之病毒懸浮於 LDS buffer (H_2O、1.25M Tris-HCl , pH 6.8、10% SDS、4% β-mercaptoethanol、10% Sucrose)，沸水處理 3 分鐘後，進行 SDS-PAGE 電泳分離，150 伏特通電 1 小時，取出膠體以coomassie blue staining 進行染色 30 分鐘，再以退染劑 (Destaining solution) 退染 30 分鐘。分子量之決定以 Gene Mark (吉恩馬克公司) 之 SDS-molecular weight marker，分別爲 176、122、80、51、38、25、18、12、9 kDa 做爲標記蛋白。

血清學試驗

瓊脂雙向擴散反應 (SDS-agar gel double diffusion test)：爲瞭解本研究中之病毒與其它 potyviruses 之親緣關係，依 Puricifull and Batchelor [17] 的方法，將單斑奎藜與抗血清，分別置入孔中以進行抗原抗體反應 16 小時；此外另以 *Bean common mosaic virus* (BCMV)、*Blackeye cowpea mosaic virus* (BlCMV)、*Chilli veinal mottle virus* (CVMV)、*Lily mottle virus* (LiMV)、*Melon vein banding mosaic virus* (MVbMV)、*Passionfruit crinkle virus* (PCV)、*Papaya ringspot virus* (PRSV)、*Potato virus* Y (PVY)、*Passionfruit woodiness virus* (PWV)、*Tuberose mild mosaic virus* (TMMV)、*Turnip mosaic virus* (TuMV)、*Watermelon mosaic virus* (WMV-2)、*Zantedeschia mosaic virus* (ZaMV)、*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) 等 14 種 potyviruses 病毒抗血清與單斑奎藜及黃化嵌紋茉莉花病葉進行反應，同時再以同上之 14 種 potyviruses 病毒抗原與本研究所製備之抗血清進行擴散反應，以瞭解本病毒與上述病毒之血清學關係。

西方轉漬反應 (Western blotting)：病毒鞘蛋白經 SDS-PAGE 電泳分離後，取下膠體，使用 Bio-Rad mini electroblot cell 裝置，以 100 伏特通電1小時，使膠體上的蛋白質轉漬於 PVDF 膜上。將 PVDF 膜剪成兩半，分別置入稀釋 1000 倍之自製抗血清及稀釋 200 倍的 Potyvirus-specific monoclonal antibody (購自Agdia Co.) 中，再分別以Blocking solution (1x TBST、0.05% milk) 稀釋200 倍的山羊抗兔 (AP-goat anti-rabbit) 及山羊抗鼠 (AP-goat-anti-mouse) 之二次抗體進行反應，最後以 AP kit (Bio-Rad AP substrate kit) 做爲呈色基質進行呈色，呈色後以蒸餾水漂洗終止反應並觀察反應結果。

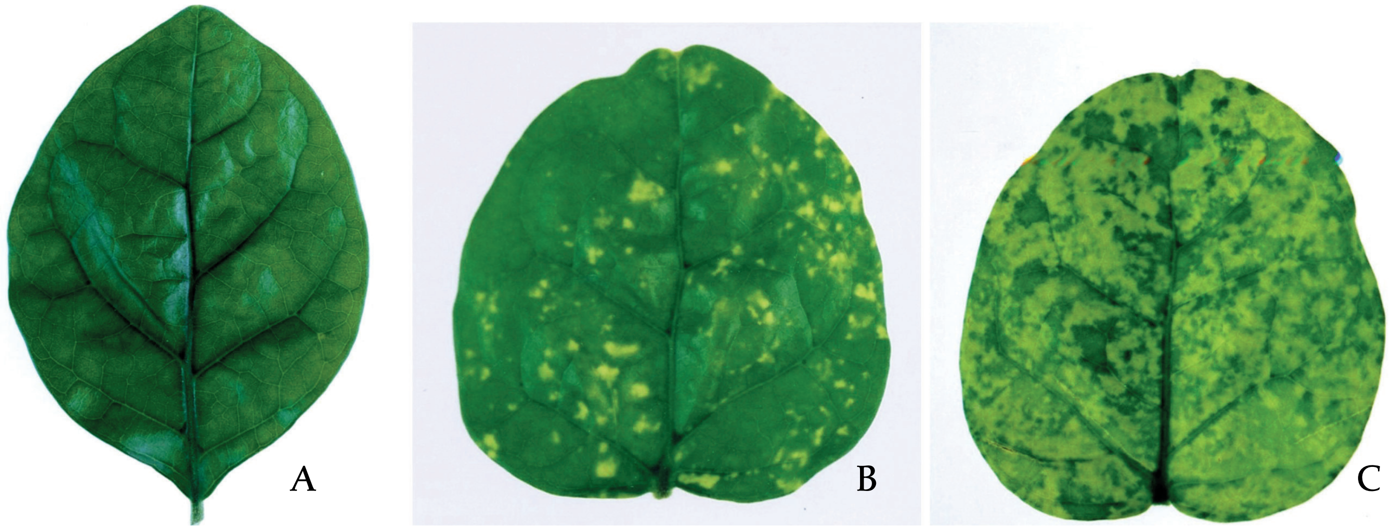
間接式酵素連結免疫吸附法 (indirect ELISA)：依蘇[6]之方法加以修改，將前述抗血清之免疫球蛋白純化，供 indirect ELISA 之用。以indirect ELISA 最佳反應條件即植物汁液稀釋 10 倍、IgG 濃度5 μg/ml 及 IgG 吸附健康奎藜汁液之稀釋倍數 10 倍 ，將田間無病徵感染之茉莉花 (光武、梓官、義亭、小港、東片、鹽埔、山明路) 及黃化嵌紋之茉莉花 (洛陽、歸來、五房、岡山、鳳林、內坑、長春) 等十四個地區之茉莉花葉片進行 indirect ELISA；另也以罹病奎藜、黃化嵌紋茉莉爲抗原與購自 Agdia Co. 之 Potyvirus-specific monoclonal antibody 之抗血清及 BYMV-PV2、LiMV、 PRSV-W、PVY、TMMV、ZYMV 等 6 種 potyvirus 之抗血清進行反應，測試其親緣關係。

鞘蛋白基因之選殖與分析

反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)：利用 one step RT-PCR (Genemark, One-Step RT-PCR Kit) 來進行鞘蛋白基因之選殖。取感染茉莉花病毒T之單斑奎藜病葉、茉莉花黃化嵌紋病葉、無病徵感染之茉莉花葉、健康奎藜等之組織 0.1 g，於液態氮中研磨成粉，以植物全量 RNA 純化試劑組 (Qiagen, Hilden, Germany) 萃取全量的 RNA，以針對 Potyvirus 屬病毒之廣效性引子對 HRP5 (5’-ATG ATH GAR KCN TGG GGG-3’) 及 Pot1 (5’-AGC TGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT-3’)[16]，直接進行 one step RT-PCR 反應，反應時於每一 25 μl 反應體積中分別加入1.5 μl RNA、5 μl 5x Enhancer buffer、5 μl 5x Reaction

圖一、茉莉花葉片呈現黃化嵌紋之病徵。(A) 田間茉莉花植株；(B) 溫室扦插植株。

Fig. 1. Yellow mosaic symptom on jasmin. (A) jasmin in the field; (B) jasmin propagated by cuttings in greenhouse.



圖二、感染茉莉花葉片之三種病徵型。

(A) 無病徵感染型之茉莉花葉片；(B) 不規則黃斑型之茉莉花葉片；(C) 嚴重黃化嵌紋型之茉莉花葉片。

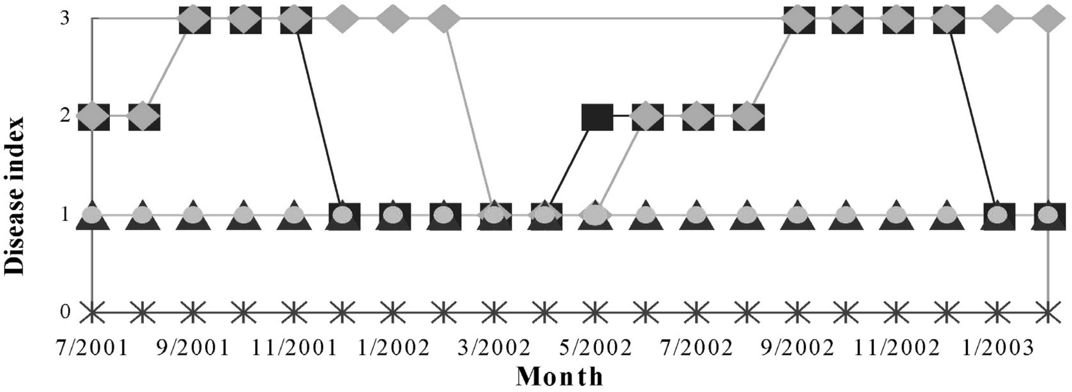
Fig. 2. Three types of symptom infected jasmin.

(A) Symptomless virus infection on jasmin; (B) Irregular yellow spot symptom on jasmin.; (C) Severe yellow mosaic symptom on jasmin.

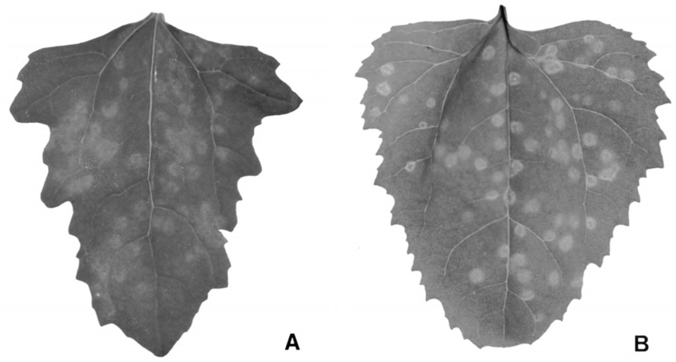
buffer、0.5 μl enzyme mix及1 pmol HRP5 及 Pot1 於熱循環器 (T3 Therocycler, Biometra) 反應，反應條件爲先 50 ℃, 30 分鐘；94 ℃, 45 秒，進行一個循環；而後 94 ℃, 45 秒；52 ℃, 50 秒；72 ℃, 1 分鐘，進行 30 個循環；最後 72 ℃, 6 分鐘進行一個循環。

基因定序與分析：以奎藜單斑爲材料所增幅之PCR產物進行選殖，將其選殖 pCRII- TOPO 載體上 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)，所篩選之選殖株送交明欣生物技術公司以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA) 進行核苷酸序列分析。解序所得資料以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Wesconsin, USA) 進行分析比對，再與 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 網站上之已知 potyviruses 序列比對，分析不同病毒間核苷酸序列、胺基酸序列和 3’端非轉譯區序列的差異性，並可進一步計算出彼此間之相同度。

專一性引子對之設計：利用 A-30 序列設計一對對應 A-30 之專一性引子 A-30-up (5’-AGA AAG TCG TTG ACG CAG-3’) 及A-30-dw (5’-CCG TAC CTT GGC ATA TAC- 3’)，可增幅出的產物長度爲 0.59 kb。以 1 pmol 之濃度與純化之病毒、感染茉莉病毒T之單斑奎藜病葉、茉



圖三、源自彰化縣花壇鄉五個茉莉花栽植區盆栽茉莉花病毒病周年病徵變化。
0~3分別代表病徵等級; 0: 無病徵感染型；1：不規則黃斑型；2：黃斑病徵漸擴大；3：嚴重黃化嵌紋型。■：長春；◆：洛陽；▲：岡山；●：歸來；⁎：義亭。
Fig. 3. The yearly fluctuation of symptom on virus infected-jasmin from five major plantations at Changhua county, central Taiwan.Disease indexes (0~3) indicate symptomless infection, irregular yellow spot, advanced yellowing and severe yellow mosaic, respectively. ■：Changhua；◆：Louiang；▲：Gangshan；●：Guilai；⁎：Iting.



圖四、單斑分離後之病毒接種於藜科植物葉上之病徵。(A) 奎藜上之黃色局部單斑；(B) 紅藜上之黃色局部單斑。
Fig. 4. The local lesion symptom on leaf of chenopodiaceous plant. (A) Chlorotic local lesions on *C. quinoa*；(B) Chlorotic local lesions on *C. amaranticolor*.

莉花黃化嵌紋病葉、健康之奎藜、無病徵感染之茉莉花葉、A-30 之 plasmid 為模板，進行 RT-PCR，反應之黏合溫度為 56 ℃。此外並利用對應 A-30 之專一性引子對將田間葉片無病徵感染 (光武、梓官、義亭、小港、東片、鹽埔、山明路) 及葉片黃化嵌紋(洛陽、歸來、五房、岡山、鳳林、內坑、長春) 等共十四個地區之茉莉花進行 RT-PCR 之檢測。

結　果

田間病徵及病害發生調查

以病徵目視法調查茉莉花主要產區彰化縣花壇鄉灣雅村、灣東村、三春村、永春村及長春村等五個主要茉莉花栽培區，結果發現五個地方之茉莉花葉片上皆具有嚴重黃化嵌紋病徵 (圖一, A)，各村罹病率皆高達 70% 以上，分別為 75%、75%、80%、73%、74%；採自高雄及屏東共十四個地區插穗扦插於溫室成苗之茉莉花盆栽共 87 盆，結果發現源自彰化的長春、高雄的鳳林二路、岡山鎮、內坑村及屏東的五房村、洛陽、歸來 44 盆之茉莉花葉片皆呈現黃化嵌紋的病徵 (圖一, B)，而源自高雄的小港區、山明路、光武路、梓官鄉及屏東的萬丹鄉、鹽埔鄉、義亭村、東片村之 43 盆茉莉花葉片皆無病徵。

茉莉花周年性病徵變化調查

自 2001 年 7 月至 2003 年 2 月期間，每個月定期調查源自彰化縣花壇鄉長春村、高雄縣岡山鎮、及屏東縣九如鄉洛陽村、屏東市歸來里、內埔鄉義亭村五處試區之盆栽茉莉花葉部病徵表現及變化，結果發現屏東縣內埔鄉義亭村為病徵等級 0 之全年無病徵感染型 (圖二, A)；高雄縣岡山鎮及屏東市歸來里為病徵等級1之全年不規則黃斑型 (圖二, B)；彰化縣花壇鄉長春村及屏東縣九如鄉洛陽村為病徵等級3之嚴重黃化嵌紋型 (圖二, C)，但在春季 (3-5月) 整叢茉莉花葉片病徵會逐漸轉變為病徵等級 2 之較輕微型 (圖三)。配合每月紅藜、奎藜接種分離情形，義亭之無病徵感染型及長春之嚴重黃化型每月皆可成功地分離到病毒，但其餘地區之分離情形則較不穩定。

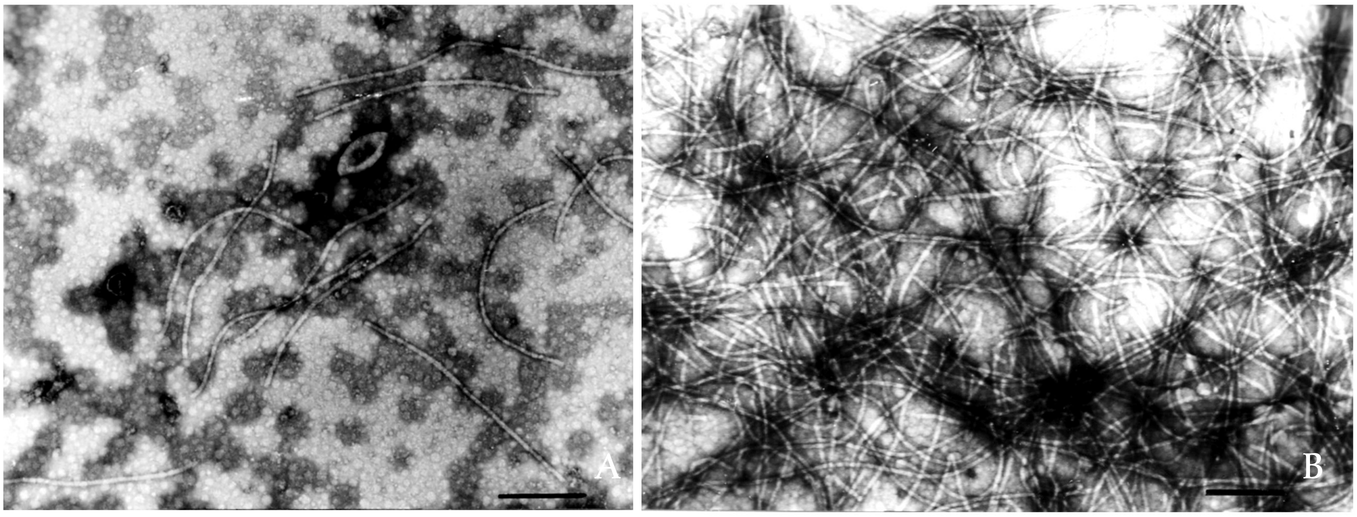
寄主範圍測定

本研究共接種 12 科 56 種供試植物 (如表一所示)，僅藜科的紅藜、奎藜及綠藜 (*C. murale*) 等 3 種藜科植物受感染，葉部呈現局部斑點病徵 (圖四)，電顯檢查接種所產生之病斑，皆可觀察到長絲狀病毒粒子，其餘植物之接種葉或新葉上皆無局部或系統性病徵，亦無法成功回接至紅

表一、茉莉花病毒T之寄主植物反應

Table 1. The host range test to jasmin virus T by mechanical inoculation

Test Plants	Symptom[1]	EM[2]	Back inoculation3
Amaranthaceae (莧科)			
Celosia argentea (雞冠花)	−	−	−
Gomphrena globosa (千日紅)	−	−	−
Asteraceae (菊科)			
Callistephus chinensis (雲南菊)	−	−	−
Chrysanthemum coronarium (茼蒿)	−	−	−
Lactuca sativa (萵苣)	−	−	−
Chenopodiaceae (藜科)			
Chenopodium amaranticolor (紅藜)	L.L.	+	+
Chenopodium quinoa (奎藜)	L.L.	+	+
Chenopodium murle (綠藜)	L.L.	+	+
Convolvulaceae (旋花科)			
Ipomoea reptans (甕菜)	−	−	−
Ipomoea nil (牽牛花)	−	−	−
Cruciferae (十字花科)			
Brassica campestris (油菜)	−	−	−
Brassica chinensis 白菜(農友2號)	−	−	−
Brassica juncea 芥菜(雪裡蕻)	−	−	−
Brassica oleracea var. capitata 甘藍(夏光)	−	−	−
Brassica oleracea var. botrytis (花椰菜)	−	−	−
Brassica rapa (蕪菁)	−	−	−
Raphanus sativus (蘿蔔)	−	−	−
Cucurbitaceae (葫蘆科)			
Benincasa hispida (冬瓜)	−	−	−
Cucumis anguria (小胡瓜)	−	−	−
Cucumis etuliferus (刺角瓜)	−	−	−
Cucumis melo (越瓜)	−	−	−
Cucumis melo (甜瓜)	−	−	−
Cucumis melo (哈蜜瓜)	−	−	−
Cucurbita pepo 南瓜(東昇)	−	−	−
Cucurbita pepo var. Zucchini (矮南瓜)	−	−	−
Cucumis sativus (大胡瓜)	−	−	−
Luffa cylindrica (絲瓜)	−	−	−



圖五、茉莉花病毒T粒子之陰染電顯圖。(A) 奎藜單斑之病毒粒子；(B) 純化之病毒粒子。

Fig. 5. Electron micrograph of filamentous virus particles of jasmin virus T.(A) Local lesion of *C. quinoa*；(B) purified virus particles. Bar=240 nm

表一、茉莉花病毒T之寄主植物反應 (續)

Table 1. The host range test to jasmin virus T by mechanical inoculation (cont'd)

Test Plants	Symptom[1]	EM[2]	Back inoculation[3]
Leguminosae (豆科)			
Cassia occidentalis (望江南)	－	－	－
Vigna unguiculata (豇豆)	－	－	－
Malvaceae (錦葵科)			
Abelmoschus esculentus (黃秋葵)	－	－	－
Nyctaginaceae (紫茉莉科)			
Mirabilis jalapa (煮飯花)	－	－	－
Solanaceae (茄科)			
Capsicum annuum (藍星甜椒)	－	－	－
Capsicum annuum (辣椒)	－	－	－
Datura candida (蔓陀蘿)	－	－	－
Lycopersicon esculentum (番茄)	－	－	－
N. benthaminana	－	－	－
N. debneyii	－	－	－
N. glutinosa	－	－	－
N. tabacum var. Havana	－	－	－
N. tabacum cv. Hicks (喜國士)	－	－	－
N. tabacum var. kentackey	－	－	－
N. rustica	－	－	－
N. tabacum var. samsun	－	－	－
N. tabacum var. TT5 (台煙五號)	－	－	－
N. tabacum cv. Vam Hicks (萬國士)	－	－	－
N. tabacum var. white barley	－	－	－
Petunia hybrida (矮牽牛)	－	－	－
Physalis alkekengi var. *franchetii* (酸漿)	－	－	－
Solanum mammosum (五指黃水茄)	－	－	－
Solanum melongena (茄子)	－	－	－
S. melongena var.serpentinum (屏東長茄)	－	－	－
Solanum torvum (水茄)	－	－	－
Umbelliferae (繖形花科)			
Coriandrum sativum (芫荽)	－	－	－
Daucus carota (胡蘿蔔)	－	－	－
Zingiberaceae (薑科)			
Alpinia speciosa (月桃)	－	－	－

1. L.L.: local lesion ；－: no reaction
2. ＋ : filamentous virus particle were evidenced by electron microscopy ; － : no virus particles were observed by electron microscopy
3. ＋ : successfully inoculated to *C. amaranticolor* ; － : not successfully inoculated to *C. amaranticolor*

藜上，且電顯檢查也未發現有任何病毒粒子之存在 (表一)。

病毒之物理性質測定

病毒之熱不活化溫度 50-55 ℃ 之間，耐稀釋度為 10^{-3} ～10^{-4}，室溫 24 ℃ 時感染力僅能維持 2-3 天，保存於-70 ℃ 時，經過 10 個月病毒仍具感染力 (表二)。

電子顯微鏡的觀察

陰染法 (Negative staining)：電顯陰染檢查具黃化嵌紋病徵之茉莉花葉片粗汁液，可觀察到三種大小明顯不同之病毒顆粒，分別為大於 1000 nm、720-750 nm 及 600-630 nm；單斑分離之奎藜單斑，可見到一種絲狀病毒粒子 (圖五, A)，長度介於 720-750 nm 之間。

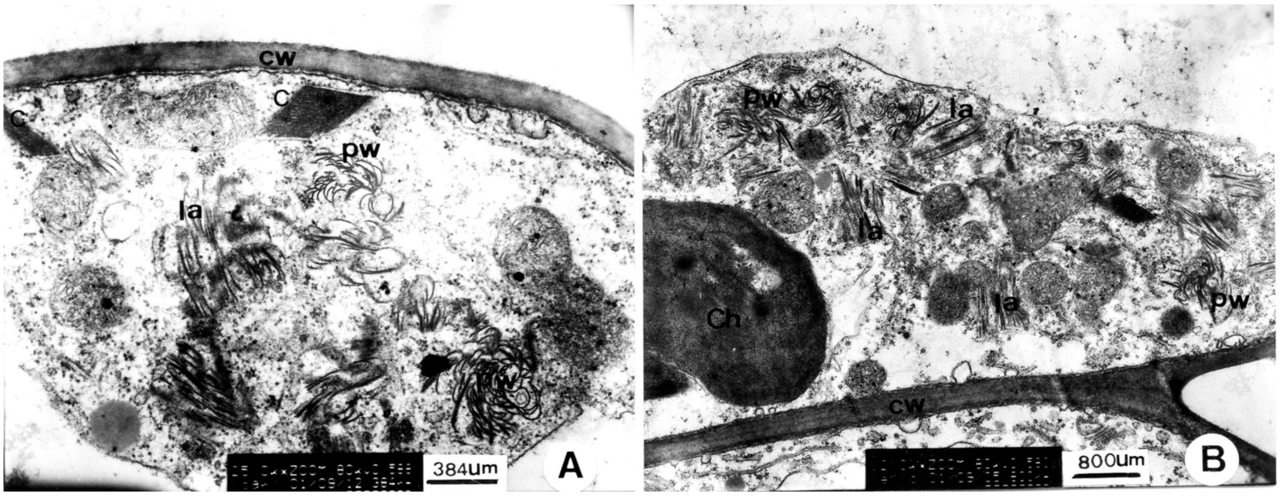
超薄切片法 (Ultrathin section)：電顯觀察紅藜單斑之切片，可觀察細胞質內病毒誘導內含體之聚集，並觀察到細胞質內 potyvirus 所具有之風車狀 (pinwheels) 及薄板狀 (laminated aggregates) 內含體，另外也可觀察到病毒誘導產生之結晶物 (crystal) (圖六)；而在黃化嵌紋茉莉花病組織之切片中，可觀察到葉綠體之葉綠餅 (grana) 及板層 (lamella) 扭曲變形，並有空泡產生 (圖七、 A,B,C)，空泡內包含粒線體及病毒顆粒之聚集 (圖七、B,C)，葉綠體有突出物 (extrusions) 之形成 (圖七、D)，且會延伸產生管狀結構 (tubular sructures) 累積在細胞質內 (圖八、B) ，細胞核內具有大量異染色質 (heterochromatin) 之聚集 (圖八,

表二、茉莉病毒T在茉莉花病葉汁液中之穩定性試驗

Table 2. Stabilities of jasmin virus T in jasmin leaf extracts

Test item	Treatment									
Thermal inactivation point (℃)	30	40	50	55	60	70	80	90	99	
	13.3[1)]	11.7	5.1	0.5	0	0	0	0	0	
Dilution end point	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}			
	16.6	3.0	0.4	0.3	0	0	0			
Longevity in vitro at 24 ℃	0	1	2	3	4	5	6			
(day)	15.8	4.0	2.4	0.5	0	0	0			
Longevity in vitro at -70 ℃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(month)	24.8	14.0	6.2	20.8	32.3	7.3	11.5	7.0	3.2	1.3

1. Average of local lesions/leaf on *C. amaranticolor*.



圖六、受茉莉花病毒T感染之紅藜單斑葉片超薄切片電顯圖。(A, B) 細胞質內病毒誘導產生之風車狀 (pw)、薄板狀 (la) 內含體及結晶物 (c)。

Fig. 6. Electron micrographs of jasmin virus T-infected leaves of C. amaranticolor by ultrathin section. (A, B) Virus induced pinwheels (pw), laminated aggargates (la) inclusions and crystal (c) in the cytoplasm.

C)，粒線體被分裂退化 (圖八、D)。

病毒純化及多元抗體之製備

單斑之奎藜病葉 250 克，經分離部份純化再經硫酸銫密度梯度離心純化後，於PET離心管距液面 6.75 公分處發現一淡黃色綿密狀環帶，經電顯檢查可見到大量長絲狀病毒粒子 (圖五、B)，以分光光度計 (Hitachi U-2001, Spectrophotometer) 測讀波長 220 nm 至 320 nm 紫外光吸收圖譜， Amax/Amin 比值為 1.02，A260/A280 之比值為 1.39，以 potyvirus 之 extinction coefficient = 2.4 為定量標準計算純化所得之病毒濃度為 6.30 mg/ml，估計每 100 克奎藜葉片所得之純化病毒收量為約 1.8 mg。免疫注射後之白兔處取得之抗血清經環形界面法測得其力價為 512 倍。

病毒鞘蛋白分子量測定

純化之病毒經 SDS-PAGE 電泳分析及西方轉漬分析病毒鞘蛋白，與標記蛋白比對，以內插法估算得知病毒鞘蛋白分子量約為 32 kDa (圖九)。

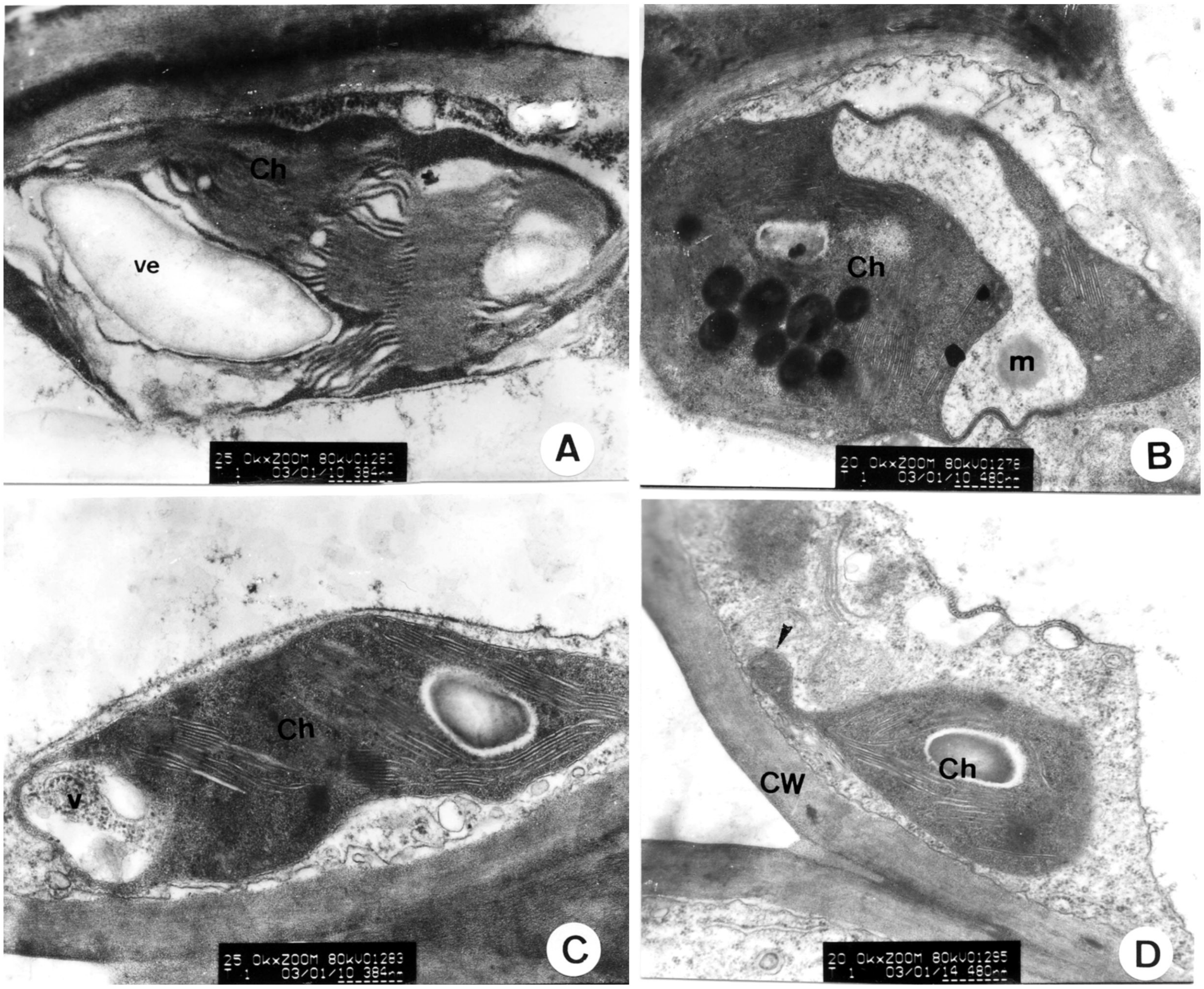
血清學反應

在進行瓊脂雙向擴散反應之結果中，單斑奎藜只與本研究所製備之抗血清呈現同源正反應，並不與 14 種 potyviruses 病毒抗血清反應，另外本病毒所製備之抗血清只與同源抗原有反應，不與BCMV 等 14 種potyviruses 之抗原反應。利用 indirect ELISA 測定本研究所製備之抗體及購自 Agdia Co. 之 *Potyvirus*-specific monoclonal antibody 之抗血清與罹病奎藜、黃化嵌紋茉莉之反應性，結果本研究之抗原均與二種供試抗體產生正反應，然而本研究抗原均不與 BYMV-PV2 等 6 種 potyviruses 反應；另外針對高屏地區田間具黃化嵌紋病徵與無病徵感染茉莉花葉片進行病毒檢測，結果顯示田間各地茉莉花病葉中所含的病毒量各不相同。

鞘蛋白基因之定序與分析

RT-PCR分析

單斑奎藜、黃化嵌紋茉莉花病葉、健康奎藜、無病徵

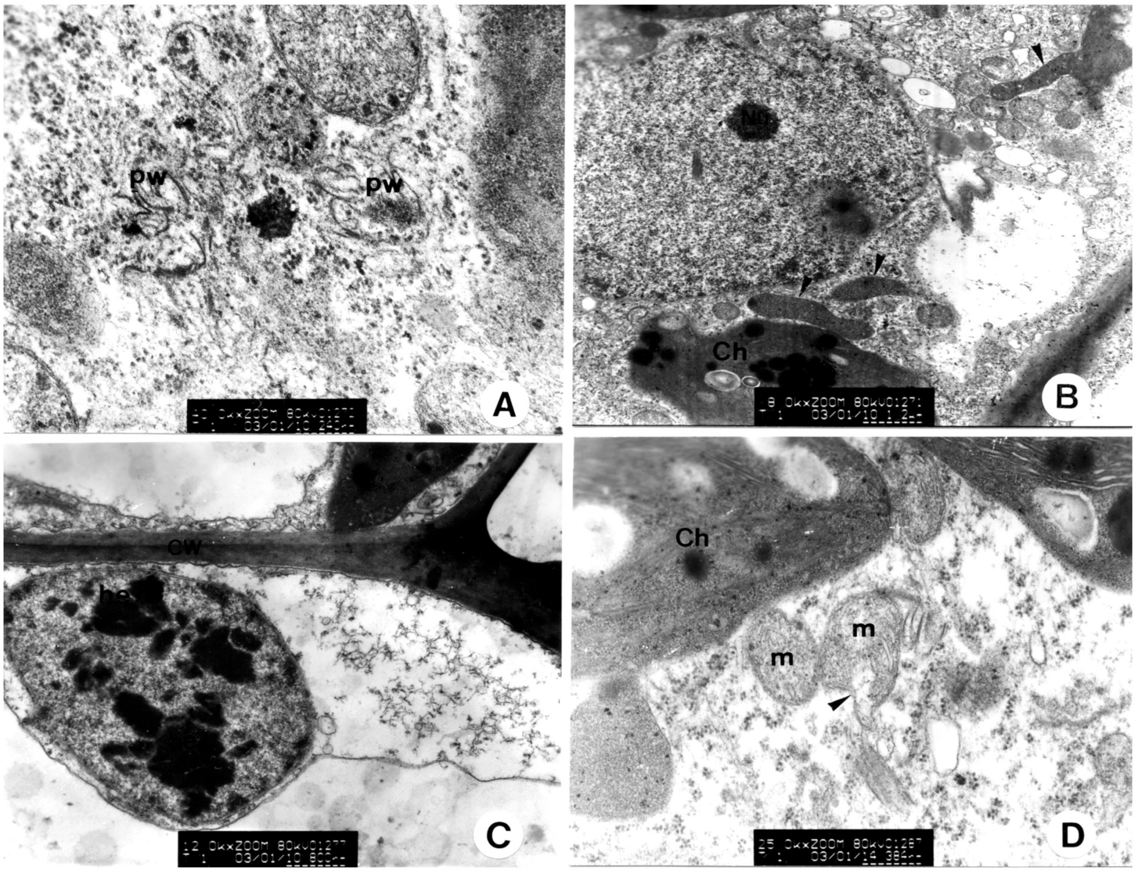


圖七、茉莉花黃化嵌紋病病葉細胞之葉綠體病變電顯圖。
(A) 葉綠體內部形成空泡 (ve) , 葉綠餅及板層扭曲變形; (B,C) 空泡內包含粒線體 (m) 及病毒顆粒 (v) 之聚集; (D) 突出物之形成 (箭頭所示)。
Fig. 7. Electron micrographs of chloroplast alterations in virus-infected leaf of jasmin showing yellow mosaic symptom.(A) The grana and lamella were distorted and transfigured, vesicle were induced in the chloroplast; (B,C) The chloroplast with a vesicle containing a mitochondrion (m) and viral particles (v); (D) Extrusions were induced in the chloroplast (arrow head indicated).

感染之茉莉花，進行 one step RT-PCR 反應，結果除健康奎藜外，其餘皆可增幅出一約 1.4 kb 之核酸產物 (圖十)，將此 1.4 kb 之片段回收並選殖於 pCRII-TOPO 載體上。選殖株送交明欣生物技術公司，以核酸自動定序儀分析解讀其核酸序列，結果由 A-30 選殖株解讀出全長度含 1289 個核苷酸 (nucleotide, nt) 之序列。經分析比對後證實此序列的確符合 Potyvirus 屬病毒 3’端基因體之典型架構。核酸片段經選殖及核苷酸序列分析後，共解得全長含 1289 個核苷酸 (nucleotide, nt) 之序列。經分析比對後證實此序列的確符合 Potyvirus 屬病毒 3’端基因體之典型架構，由 5’端起此序列分別含 186 nt 之細胞核內含體 (nuclear inclusion b, NIb) 基因之 3’端部分序列、837 nt 之全長度鞘蛋白 (coat protein, CP) 基因與一個 202 nt 之3’端非轉譯區 (3’non-coding region, 3’-NCR) 以及一個 64 nt 之 poly A 尾端。由鞘蛋白 N 端起第 8-10 個胺基酸位置具有代表 potyvirus 蚜媒傳播能力之 DAG 序列 (圖十一)。

核苷酸序列之分析

本研究之茉莉分離株病毒選殖株經由核苷酸解序後，與 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 網站上查詢到的國外報告中 100 個已登錄於 GenBank 有親緣關係之前 20 個親緣關係較近 potyviruses 進行鞘蛋白序列比對，其 CP 及3’-NCR 區域中之核苷酸序列相同度分別低於 69 及 54%；CP 之胺基酸序列相同度則低於69% (表三)。



圖八、茉莉花黃化嵌紋病病葉細胞胞器病變電顯圖。
(A) 細胞質內具風車狀 (pw) 內含體 ; (B) 葉綠體膜於細胞質中延伸形成管狀構造 (箭頭所示) ; (C) 細胞核內產生異染色質 (he) ; (D) 粒線體 (m) 被分裂退化 (箭頭所示)。
Fig. 8. Electron micrographs of cytological alterations in virus-infected leaf of jasmin showing yellow mosaic symptom.(A) The pinwheel (pw) inclusions in cytoplasm ; (B) The chloroplast membrane elongated tubular structures in the cytoplasm (arrow head indicated) ; (C) The heterochromatins in the nucleus (he) ; (D) The mitochondria (m) were lobed and degenerated (arrow head indicated).

專一性引子對之設計

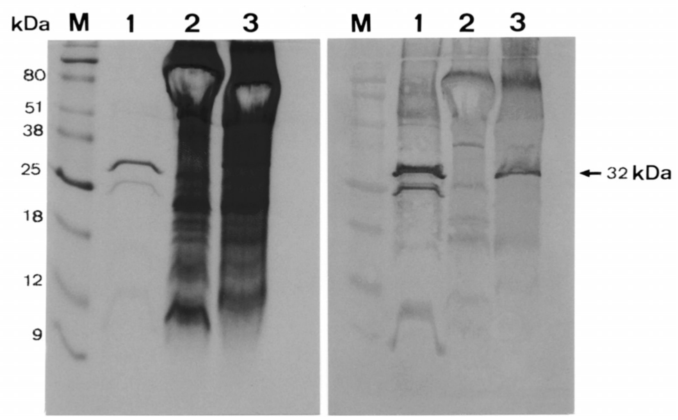
純化病毒、單斑奎藜、健康奎藜、黃化嵌紋茉莉花、無病徵感染之茉莉花，以所設計之一對對應 A-30 可增幅出產物長度 0.59 kb 之專一性引子，進行 one step RT-PCR 後，結果除健康奎藜外，其餘皆可增幅出所預期之 0.59 kb 片段 (圖十二)。此外亦取田間具黃化嵌紋病徵 (高雄地區鳳林、岡山鎮、內坑村及屏東的五房村、洛陽、歸來、彰化縣之長春村) 與無病徵感染 (高雄地區之小港區、三民路、光武路、梓官鄉及屏東地區鹽埔鄉、義亭村、東片村) 茉莉花葉片與所上述設計之專一性引子進行 one step RT-PCR，結果在約 0.59 kb 的位置皆可增幅出所預期之片段。

討　論

1995 年本研究室於高屏地區首度發現茉莉花植株葉片出現黃化嵌紋之病徵，經由機械接種會在紅藜及奎藜上呈現局部單斑，病毒粒子長 720-750 nm 微彎曲長絲狀，超薄切片在紅藜單斑病組織細胞質中觀察到 potyvirus 所具有之典型風車狀 (pinwheels) 及薄板狀 (laminated aggregates) 內含體，這些性質皆與 potyviruses 之基本生物特性相符 (19,22)，由病毒型態、基本生物特性及細胞學證據，初步鑑定本研究所分離之病毒應屬 Potyviridae 科病毒成員之一。

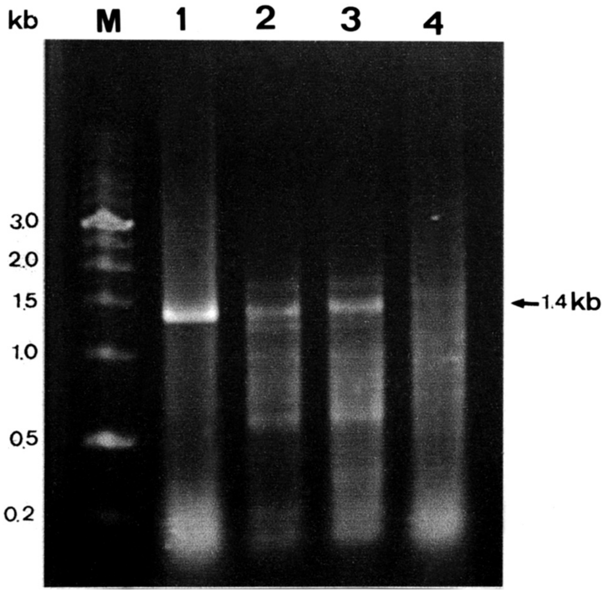
本研究每月定期以機械接種方式分離來自五個不同地區茉莉花病葉，分離結果皆不甚穩定，Bellardi and Bertaccini [7] 推測茉莉花和其它茉莉花屬的植物體內具芳香物質 (aromatic substances) 或香精 (essences) 等抑制物質，使得機械接種分離困難，因此推測此亦可能爲本研究分離困難或無法持續穩定之原因。

電顯觀察具黃化嵌紋病徵之茉莉花病葉粗汁液，除發現到本病毒粒子之存在外，另可觀察到長度介於 600-630 nm 之絲狀病毒粒子，與 Bellardi and Bertaccini [7] 於義大利之重要裝飾灌木之茉莉花中所發現之病毒粒子大小介於 620-660 nm 之 carlavirus 病毒相似，但兩者是否爲相同之



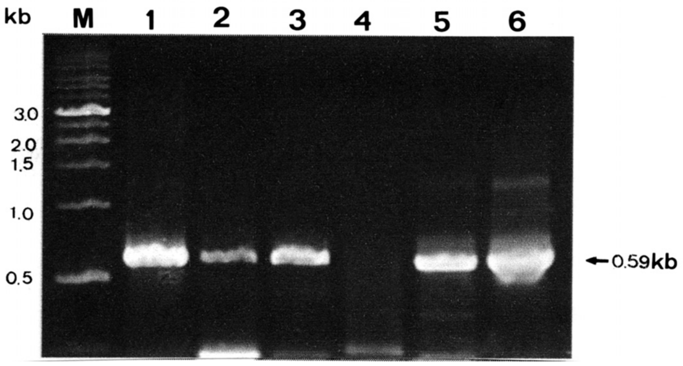
圖九、應用聚丙烯醯胺凝膠電泳 (左) 及西方轉漬法利用自製茉莉花病毒T抗血清 (右) 估量純化茉莉花病毒 T 鞘蛋白分子量。M:標記蛋白；1:純化病毒；2:健康奎藜；3:單斑奎藜病葉。

Fig. 9. The determination of molecular weight of viral coat proteins of purified jasmin virus T by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Left) and western blotting analysis used antiserum against jasmin virus T (Right).Lane M: Protein markers; Lane 1: The purified virus; Lane 2: The healthy quinoa; Lane 3: The single local lesions on *C. quinoa*.



圖十、利用對應potyviruses之廣效性引子對(Pot1/HRP5)就感染茉莉病毒T之單斑奎藜病葉進行one step RT-PCR分析,增幅出約1.4 kb之DNA產物。M: 標準100 bp DNA標誌 (0.2-14.0 kb)；Lane 1: 感染茉莉病毒T之單斑奎藜病葉；Lane 2:黃化嵌紋之茉莉花；Lane 3: 無病徵感染之茉莉花；Lane 4: 健康之奎藜。

Fig. 10. One-step reverse-transcription polymerase chain reaction (one step -PCR) using a pair of Potyvirus-specific degenerate primer (Pot1/HRP5) to react with jasmin virus T-infected *C. quinoa* was conducted and a 1.4 kb DNA products was amplified.M: 100 bp DNA markers; Lane 1: jasmin virus T-infected *C. quinoa*; Lane 2: jasmin with yellow mosaic symptom; Lane 3: symptomless virus-infected jasmin; Lane 4: healthy *C. quinoa*.



圖十二、以本研究所設計之專一性引子對 (A-30-up/A-30-dw) 就純化之茉莉病毒T進行one step RT-PCR分析，可增幅出約 0.59 kb 核酸產物。M: 標準100 bp DNA標誌 (0.2~14.0 kb); Lane 1: 純化之病毒; Lane 2: 感染茉莉病毒T之單斑奎藜病葉; Lane 3: 黃化嵌紋茉莉花病葉; Lane 4: 健康之奎藜; Lane 5: 無病徵感染之茉莉花; Lane 6: A-30之plasmid 爲對照模版。

Fig. 12. One-step reverse-transcription polymerase chain reaction (one step RT-PCR) using a pair of primer (A-30-up/A-30-dw) designed for specific detection of an estimated 0.59 kb product from purified preparation of jasmin virus T.M: 100 bp DNA markers; Lane 1:purified preparation of jasmin yellow mosaic virus; Lane 2: jasmin virus T-infected C. *quinoa*; Lane 3: jasmin showing yellow mosaic symptom; Lane 4: healthy C. *quinoa*; Lane 5: symptomless virus-infected jasmin;Lane 6: plasmid of A-30 as template.

病毒種類，有待日後詳加探討；另外也可觀察到一長度大於 1000 nm 長絲狀病毒粒子，依據其病毒粒子長度應爲 *Closterovirus* 屬之病毒[22]，是否爲另一新紀錄之病毒，有待日後進一步去探討，由此推測茉莉花病葉內至少具三種以上長度相異之病毒粒子，可能爲一複合感染之病毒病害。

病毒感染植物通常會造成寄主組織與細胞在構造及功能發生改變及干擾，導致寄主產生黃化、嵌紋、矮化、畸形等各種病徵[15]。其中尤以參與光合作用之葉綠體病變破壞而致阻礙植物光合作用之進行，進而阻礙葉綠素之合成，使得葉片出現黃化嵌紋病徵最爲常見。本研究電顯觀察茉莉花病組織切片，發現葉綠體之葉綠餅 (grana) 及薄板 (lamella) 發生扭曲變形之改變，與正常細胞葉綠體構造明顯不同，推測此應爲造成茉莉花黃化嵌紋病徵之重要原因之一。

本研究所觀察到之病徵等級 0：無病徵感染型，於電顯檢查時可見到與具黃化嵌紋病徵相似之病毒粒子，且可機械接種分離成功，利用購自 Agdia Co. 之 *Potyvirus*-specific monoclonal antibody 之抗血清進行 ELISA 檢測也呈正反應，PCR 偵測亦增幅出與單斑奎藜、黃化嵌紋病徵之茉莉花相同約 1.4 kb 的 DNA 產物，顯示田間無病徵之

```
agctgggtattggagcaatcccccctacaatagtctggctgaaacaggaaaagcaccatat   60
 S  W  V  L  E  Q  S  P  Y  N  S  L  A  E  T  G  K  A  P  Y     20
gtggctgagacagcgctacgaaatctatacctggaagttgaggccaccgaaatggaattg  120
 V  A  E  T  A  L  R  N  L  Y  L  E  V  E  A  T  E  M  E  L     40
ttgcgttatctggaagggttcaatcgcgaatacgaagaggcgatgtttgaagacgtgcac  180
 L  R  Y  L  E  G  F  N  R  E  Y  E  E  A  M  F  E  D  V  H     60
tttcagtcaggtgaagagaaagtcgttgacgcaggacaagatggtgacggaaaacaggga  240
 F  Q/ S  G  E  E  K  V  V  D  A  G  Q  D  G  D  G  K  Q  G     80
gatgataaaggcaaaggattggagagagaaatcattataccaaaaggtgaagaaaattct  300
 D  D  K  G  K  G  L  E  R  E  I  I  I  P  K  G  E  E  N  S    100
ctcaaaaaccgagacaaagatgtgaatgcagttacgatgggcacttatcaagtaccgagg  360
 L  K  N  R  D  K  D  V  N  A  V  T  M  G  T  Y  Q  V  P  R    120
ctgaaaacaatcacagctaagatgaatttgccacgagatcagcaacaactcgcaatcaac  420
 L  K  T  I  T  A  K  M  N  L  P  R  D  Q  Q  Q  L  A  I  N    140
ttggaccacttgttacaatatagcccgaaacaagttgatttagctaacacaagggcaaca  480
 L  D  H  L  L  Q  Y  S  P  K  Q  V  D  L  A  N  T  R  A  T    160
aagcgccagtttgaaacttggtatgatggtgtgaagtcagattacgatgtgtcggatgag  540
 K  R  Q  F  E  T  W  Y  D  G  V  K  S  D  Y  D  V  S  D  E    180
ggaatgcaaataattctcaacggactactcgtctggtgcattgaaaatgggacttcccca  600
 G  M  Q  I  I  L  N  G  L  L  V  W  C  I  E  N  G  T  S  P    200
aatattaacggcgtgtgggtcatgatggatggcgatgagcaagtggaatatccaattaag  660
 N  I  N  G  V  W  V  M  M  D  G  D  E  Q  V  E  Y  P  I  K    220
ccattaattgaacatgctaaacccacgtttagacaaatcatggcccacttcagcaatgtt  720
 P  L  I  E  H  A  K  P  T  F  R  Q  I  M  A  H  F  S  N  V    240
gctgaagcttacattgaaaagaggaatatgacggagccgtatatgccaaggtacgggctc  780
 A  E  A  Y  I  E  K  R  N  M  T  E  P  Y  M  P  R  Y  G  L    260
caacgcaatctcaccgatatgagtctagctcggtatgcttttgatttctatgagatgaca  840
 Q  R  N  L  T  D  M  S  L  A  R  Y  A  F  D  F  Y  E  M  T    280
tccaaaacaccagttagagctcgtgaggcccacatacaaatgaaggctgctgcattaaga  900
 S  K  T  P  V  R  A  R  E  A  H  I  Q  M  K  A  A  A  L  R    300
aatgccagcacgcgactgtttgggctcgatgggaatgttgggacaaaagaggaggacacg  960
 N  A  S  T  R  L  F  G  L  D  G  N  V  G  T  K  E  E  D  T    320
gagagacatacagcagatgatgtaaatagaaacatgcataacctaatgggtgtgcgtggt 1020
 E  R  H  T  A  D  D  V  N  R  N  M  H  N  L  M  G  V  R  G    340
ctgtagtgtgttagataggtagttgtactttatgtactttatttatccgttagtttcctg 1080
 L  *                                                          358
ctttccgcatttaaataccgatagttaagagagaggtttggaacctcgttatgctttcgt 1140
tgtgtttttatgtcgacctaagtatccgcacggctaatgtggtgattctttgaatcgaat 1200
tagtcttgttggtatttagcaagagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa                                1289
```

圖十一、由 A-30 選殖株基因組之 3’末端區域共解得全長度 1289 個核苷酸及其演譯之胺基酸序列。劃底線的部分爲 potyvirus 具蚜媒傳播特性的 DAG 片段及推測爲蛋白質裂解之 VHFQ/S 位置。

Fig. 11. The 1289 nucleotides and deduced amino acids sequences of the cloned 3’-terminal region of A-30. The DAG motif for aphid transmissibility and the putative protease cleavage site VHFQ/S are underlined.

表三、茉莉花病毒 T 之 A-30 選殖株與其它已知potyviruses 之鞘蛋白基因核苷酸、胺基酸及 3´ 末端非轉譯區核苷酸相同度之比較

Table 3. Comparison of the nucleotide identities, amino acid identities of the coat protein gene and the nucleotide identities of the 3’-non coding regions of jasmin virus T A-30 clone with those of other known potyviruses species

Potyvirus [2]	Assession number	Percent Identities [1]		
		CP		3´-NCR
		nt	aa	nt
CVbMV	U72193	69	68	38
JYMV	AB029404	67	65	41
JYMV	AB029507	68	66	41
PLDMV	D50082	67	58	46
PPV	AF172346	56	53	--
PPV	AF172349	55	53	--
PPV	X56258	54	52	52
PPV	X81079	56	53	48
PPV	Y09581	53	50	48
PVBV	AJ237843	69	67	43
SPFMV	D38543	57	53	49
SPFMV	S43450	57	53	29
TuMV	AB076485	68	64	--
TuMV	AB076525	65	64	--
TuMV	AB076542	67	64	--
TuMV	AB076546	67	64	--
TuMV	AF395676	66	64	48
TuMV	AJ310206	67	64	52
TuMV	AJ489259	66	65	32
TVBMV	AB020524	68	66	54

1. Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences were analyzed by the ScanDNASIS programs (Hitachi software Engineering America Ltd., California, USA)

2. Twenty potyviral sequences with highest percent similarity are selected from the GenBank for comparison. The potyviruses listed are: CVbMV (*Chilli vein-banding mottle virus*), JYMV (*Japanese yam mosaic virus*), PLDMV (Papaya leaf-distortion mosaic virus,), PPV (*Plum pox virus,*), PVBV (*Pepper vein banding virus*), SPFMV (*Sweet potato feathery mottle virus,*), TuMV (*Turnip mosaic virus*), TVBMV (*Tobacco vein banding mosaic virus*).

茉莉花並非眞正健康，而進一步以特殊設計引子對 (A-30-up/A-30-dw) 進行 RT-PCR 檢測田間茉莉，更發現無論有無病徵皆有本研究病毒存在，因此病毒應是一種普遍存在植株內之潛伏感染；由於茉莉花長期利用扦插無性繁殖，致使要取得健康種苗進行寄主回接試驗也相形困難，因此本研究所分離之新種 potyvirus 是否引起茉莉花黃化嵌紋之病徵，有待日後利用組織培養取得無病毒種苗後進一步研究。本研究病毒寄主範圍測試 12 科 56 種植物，僅能感染三種藜科造成局部性斑點，並未發現系統性感染，顯示其寄主範圍非常窄，推測亦應與病原病毒長期存於以無性方式繁殖之茉莉花植株內進行有效傳播有關。

本研究以紅藜、奎藜單斑爲病毒源進行蚜媒傳播卻未成功 (未發表)，其可能原因包括 (1) 本病毒除茉莉花外，目前尚未發現系統性寄主，紅藜、奎藜局部性病斑影響桃蚜、棉蚜之刺探 (probing) 及取食 (feeding) 行爲；(2) 文獻記載茉莉花並無蚜蟲爲害之紀錄 [14,18]，且本研究在田間亦未發現有蚜蟲之存在，而本病毒既能機械傳播且茉莉花主要以扦插方式無性繁殖，因而導致其病原病毒無須蟲媒即可以無性方式長期有效傳播，進而使得蟲媒相關基因發生變化而致喪失蚜媒特性，(3) 就鞘蛋白基因構造層次而言，可能是 CP 之 N 端暴露在病毒表面之 DAG 末端被參與蚜媒傳播之具有蛋白質分解酵素功能之非構造蛋白 HC-pro 分解，致使 DAG 結構發生改變，因而使得本病毒失去蚜媒傳播之特性 [9,23]；有關本研究進行蟲傳播尚未成功的眞正原因，仍有待日後詳加探討。

西方轉漬反應、酵素連結免疫吸附法及瓊脂雙向擴散反應等血清學試驗結果，顯示本研究之茉莉分離株病毒除僅能與本研究所製備之同源抗體及購自 Agdia Co. 之 *Potyvirus*-specific monoclonal antibody 之抗血清有正反應，並不會與 BCMV、BlCMV、BYMV-PV2、CVMV、LiMV、MVbMV、PCV、PRSV、PRV-W、PVY、PWV、TMMV、TuMV、WMV-2、ZaMV、ZYMV 等 16 種其它 potyviruses 發生正反應，顯然茉莉花分離株病毒與此16種田間常見 potyviruses 並無血緣關係，同時亦顯示此一病毒的特殊性。

雖然 indirect ELISA 能初步地用於高屏等 14 個地方

之田間茉莉花病毒檢測，但效果尚不夠理想，而以本研究所設計之一對對應 A-30 可增幅出產物長度 0.59 kb 專一性引子，針對田間具黃化嵌紋病徵與無病徵感染茉莉花葉片進行 PCR 檢測，除健康奎藜外，其餘皆可增幅出所預期之 0.59 kb 之產物；顯示在理想的血清學檢測技術開發之同時，應用PCR技術靈敏地檢測田間具黃化嵌紋之茉莉花病毒病害應是最佳的選擇。

本研究之茉莉分離株病毒選殖株與其它已知 potyviruses 之鞘蛋白基因核苷酸、胺基酸及 3’末端非轉譯區核苷酸相同度之比較，其鞘蛋白及 3’端非轉譯區之核?酸序列相同度分別低於 69 及 54%；鞘蛋白胺基酸序列相同度則低於 69% (表三)；根據 Shukla 等 [19] 指出病毒間其鞘蛋白胺基酸序列相同度在 55-75% 者定爲不同種，因此依鞘蛋白基因序列的比對結果顯示，本研究之茉莉病毒分離株應爲文獻所未曾記載之一新種 potyvirus[21]。

綜合上述病毒形態大小、基本物理特性、細胞病理學、血清學反應及核酸序列比對等種種證據，一致顯示本研究中所分離之病毒爲一分類上歸屬 *Potyviridae* 科 Potyvirus 屬之新種 *potyvirus*，由於 Benigno *et al.*[8]在菲律賓所描述之病徵與本研究之病徵等級 3 嚴重黃化嵌紋型極爲相似，且其研究顯示爲 *Potato virus* Y group，但 Benigno *et al.*[8]尚未分離成功，而本研究爲首度由茉莉花具黃化嵌紋病徵之葉片上成功分離，但兩者是否爲相同之病毒病原，有待日後進一步釐清；因本研究之茉莉分離株雖是由黃化嵌紋病徵茉莉植株所分得，但由於此病毒普遍存在於黃化嵌紋病徵及無病徵感染之茉莉植株中，而目前並無法取得無病毒健康茉莉植株以供接種，因此病徵表現與本病毒之間的相關性目前尚無法藉由病毒病原回接健康種苗加以釐清；Waterworth[24] 雖曾報導可由無病徵 *J. odoratissimum* (黃馨) 植株之花瓣 (petals) 中成功機械接種出 Jasmin latent virus 1，且可於藜科、葫蘆科、夾竹桃科、豆科、玄參科及茄科等六科八種植物上造成感染，但顯然地其與本研究之病毒寄主範圍只限於藜科三種植物有明顯地不同，有鑑於本研究病毒爲台灣及世界上首次由茉莉花病株分離之未曾紀錄的新種 potyvirus，且爲有別於前述國外記載之有關茉莉花病毒，因此特將其命名爲茉莉病毒 T [Jasmin virus T, JaVT]。

謝 辭

本研究承蒙行政院農業委員會農業試驗所植病組提供分生實驗環境及相關器材，使研究得以順利完成，特致謝忱。

引用文獻

1. 呂福原、歐辰雄、劉業經. 1994. 台灣樹木誌. 國立中央大學農業院叢書. 925pp。
2. 張萬佛. 1995. 花木綴談. 地景企業有限公司. p.124-131。
3. 陳家全、李家維、楊瑞森. 1995. 生物電子顯微鏡學. 國科會精儀中心編印. 266pp。
4. 儲農、劉守明、陳永和. 1993. 養花治百病. 躍昇文化事業有限公司. p.149-151。
5. 蘇哲男. 1987. 花壇鄉特產－茉莉花. 豐年 37(13):12-13。
6. 蘇稚林. 1999. 台灣孤挺花病毒之研究.國立高雄師範大學生物科學研究所碩士論文. 82pp。
7. Bellardi, M. G., and Bertaccini, A. 1991. Virus diseases of ornamental shrubs.Vl. Chlorotic spots and variegation of *Jasminum sambac*. Phytopathol. Medit. 30: 67-71。
8. Benigno, D. A., Favalihedayat, M. A., and Retuerma, M. L. 1975. Sampaguita yellow ringspot mosaic. Philippine Phytopathol. 11: 1-92。
9. Blanc, S., Lopez-Moya, J. J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D. W., and Pirone, T. P. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. Virology 231: 141-147.
10. Cooper, J. I. 1993. Virus diseases of trees and shrubs. Chapman and Hall, London. 205 pp.
11. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. Practical plant virology: protocols and exercises. Springer, New York, 459 pp.
12. Itaya, A., Woo, Y. M., Masuta, C., Bao, Y., Nelson, R. S., and Ding, B. 1998. Development regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. Plant Physiol. 118: 373-385.
13. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriphage T4. Nature 227: 680-685.
14. Leonhardt, K. W., and Teves, G. I. 2002. Pikake, A fragrant-flowered plant for landscapes and lei production. Ornamentals and Flowers. 29: 1-4.
15. Matthews, R. E. F. 1991. Plant Virology (3rd Ed). Academic Press, New York. 835 pp.
16. Pappu, S. S., Pappu, H. R., Chang, C. A., Culbreath, A. K., and Todd, J. W. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121-1125.
17. Puricifull, D. E., and Batchelor, D. L. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS)-treated plant viruses and plant viral inclusions. Insti. Food Agri. Sci. Florida, Gainesville. 39pp.

18. Reddy, A. S., Krishamurthy Rao, B. H., and Wilson, Y. 1978. Chemical control of jasmine (Jasminum sambac, flower crop) pests. South Indian Horticulture 26(1):25-27.

19. Shukla, D. D., Ward, C. W., and Brunt, A. A. 1994. The Potyviridae. CAB International. 516 pp.

20. Sophorn, S. 1999. Evaluation of determinate tomato inbred lines for multiple disease resistance. Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), Shanhun, Tainan, Taiwan.1-5.(http://www.arc-avrdc.org/Sop horn(17-N).pdf)

21. Tidona, C. A., and Darai, G. 2002. The Springer Index of Virus. Springer, Berlin, 1511pp.

22. Van Regenmortel, M. H. V., Fauguet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. 2000. Virus Taxonomy. Academic Press, New York, 1162 pp.

23. Wang, R. Y., Powell, G., Hardie, J., and Pirone, T. P. 1998. Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. J. Gen. Virol. 79: 1519-1524.

24. Waterworth, H. E. 1971. Physical properties and host ranges of viruses latent in and mechanically transmitted from jasmin. Phytopathology 61: 228-230.

25. Wilson, K. I. 1972. Chlorotic ringspot of jasmin. Ind. Phytopathol. 25:157-158.

ABSTRACT

Lin, Y. Y. [1], Chen, T. H.[1,3], and Chang, C. A.[2] 2004. Characterization of A New Potyvirus Isolated from Jasmin (*Jasminum sambac* (L.)Ait) in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 13: 69-84. ([1.] Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Taiwan, R.O.C.; [2.] Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.; [3.] Corresponding author, E-mail: thchen@mail.npust.edu.tw, Fax: +886-8-7740293)

A previously undescribed virus disease that caused severe yellow mosaic on leaves of jasmin plants was found in 1995 at Kaohsiung and Pingtung, Taiwan. The first discernible symptom observed is irregular yellow spot. Later, the spot advanced and making the whole leaf yellowing. Three major symptom types, i.e. symptomless virus infection, irregular yellow spot and severe yellow mosaic were evidenced in the field. The virus disease is a complex disease, more than three filamentous viruses were observed in crude saps of field jasmin. A flexuous filamentous virus of 720-750 nm in particle size, was successfully isolated by mechanical inoculation from diseased jasmin showing yellow mosaic symptom. It is the first report of jasmin virus disease in Taiwan. The thermal inactivation point of the virus was 50-55 ℃, dilution end point was 10^{-3} to 10^{-4} and the longevity *in vitro* was 2-3 days at 24 ℃ and more than 10 months at -70 ℃. Pinwheel-shaped and laminated inclusion bodies typical of potyvirus infection were found in local lesion of *Chenopodium amaranticolor*. Cellular organelles alterations of nuclei, chloroplast, mitochondria in virus-infected leaf of jasmin showing yellow mosaic symptom were also observed by electron microscopy. It had a very narrow host range restricted to three species in chenopodiaceous plants among 56 tested plant species belonging to 12 families. Attempts to transmit the virus by aphids using *C. quinoa* and *C. amaranticolor* as source plants failed. Protein with a molecular weight of 32 kDa was detected where purified virus was denatured with sodium dodecyl sulfate (SDS) and analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and by western blotting. An antiserum with a titre of 512 was obtained by immunizing a white rabbit with the purified virions. In Western blotting, indirect ELISA, SDS-agar gel double diffusion test, the antiserum against the jasmin virus isolate reacted strongly with its homologous antigens, but not to antigens of fourteen other potyviruses. In order to further characterize the virus at the molecular level, CP genes of jasmin virus isolate was cloned, sequenced and analyzed. A sequence of 1289 nucleotides (nts) was found and the percent of nucleotide identities of the CP gene and the NCR were less than 69% and 54%, comparing to twenty potyviruses, respectively. Similarly, percent identities of CP amino acid sequence to those of twenty other known potyviruses were all below 69%. The virus was identified as a new potyvirus species on the basis of its particle morphology and size, physical properties, cytopatholoy, serological characteristics and percent of nucleotide and amino acid sequences identity, and a name, Jasmin virus T, JaVT, was previsionally proposed. It is the first report about successful virus isolation from jasmin in the world.

Key words : Jasmin, Potyvirus, Virus identification, Jasmin virus T